



1645

PATENT
Attorney Docket 045636-5039-US

#4

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Lise Thibodeau *et al.*)
)
Application No. 09/632,806)
)
Filed: October 4, 2000)
)
For: Use of HIV-1 gp120 and gp160 Proteins)
Modified in the V3 Loop for the)
Preparation of Vaccine Compositions)
and Formations Containing the Same)

Group Art Unit: 1645
Examiner: Not Assigned

JUL 20 2001

RECEIVED
CENTER 1600/2900

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

A certified copy of the priority document referred to in the Declaration filed November 14, 2000, is enclosed in support of Applicants' claim for priority.

The document is an application for patent filed in France on April 4, 2000, Application No. 004310.

Dated: **July 19, 2001**
Morgan, Lewis & Bockius LLP
Customer No. **09629**
1800 M Street, N.W.
Washington, D.C. 20036
202-467-7000

Respectfully submitted
Morgan, Lewis & Bockius LLP

Red D Allen
Reg No 32,988 for

Elizabeth C. Weimar
Registration No. 44,478





RECEIVED

JUL 20 2001

TECH CENTER 1600/2900

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **27 JUL. 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">Réservé à l'INPI</div>			
REMISE DES PIÈCES DATE 4 AVRIL 2000 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0004310 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 4 AVR. 2000		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6 avenue de Messine 75008 PARIS </div>	
Vos références pour ce dossier (facultatif) BLOcp1264/11FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date ____/____/____ <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date ____/____/____			
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date ____/____/____			
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE PROTEINES gp120 ET gp160 MODIFIÉES DANS LA BOUCLE V3 DU VIH-1 POUR LA PRÉPARATION DE COMPOSITIONS VACCINALES ET FORMULATIONS LES CONTENANT.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suit »	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Norm ou dénomination sociale		FONDATION MONDIALE RECHERCHE ET PREVENTION SIDA	
Prénoms			
Forme juridique		Fondation de droit suisse	
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Adresse	Rue	1 rue Miollis	
	Code postal et ville	75732	PARIS Cedex 15
Pays		FRANCE	
Nationalité		Suisse	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE 4 AVRIL 2000 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0004310		Réservé à l'INPI		DB 540 W /260899	
V s références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>			BLOcp1264/11FR		
6 MANDATAIRE					
Nom			ORES		
Prénom			Béatrice		
Cabinet ou Société			CABINET ORES		
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel					
Adresse	Rue	6 avenue de Messine			
	Code postal et ville	75008	PARIS		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>					
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>					
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>					
7 INVENTEUR (S)					
Les inventeurs sont les demandeurs			<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée		
8 RAPPORT DE RECHERCHE			Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé			<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance			Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES			Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes					
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (N m et qualité du signataire) Béatrice ORES n° 92-4046			VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

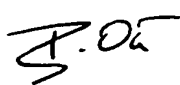
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOcp1264/11FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0004310	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
UTILISATION DE PROTEINES gp120 ET gp160 MODIFIÉES DANS LA BOUCLE V3 DU VIH-1 POUR LA PRÉPARATION DE COMPOSITIONS VACCINALES ET FORMULATIONS LES CONTENANT.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : FONDATION MONDIALE RECHERCHE ET PREVENTION SIDA			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		THIBODEAU	
Prénoms		Lise	
Adresse	Rue	1115 rue Sherbrooke, ouest, app. 2501	
	Code postal et ville	MONTREAL (CANADA)	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LAVALLEE	
Prénoms		Claude	
Adresse	Rue	2 Forest Drive, app. B	
	Code postal et ville	SPRINGFIELD (ETATS-UNIS D'AMERIQUE)	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
Béatrice ORES n° 92-4046			

La présente invention est relative à l'utilisation de protéines gp120 et gp160 modifiées dans la boucle V3 du VIH-1 pour la préparation de compositions vaccinales et ainsi qu'à des formulations les contenant, aptes à produire une réponse immunitaire humorale, cellulaire et muqueuse.

5 Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent étiologique du SIDA. Le VIH-1 induit une infection persistante chez l'humain, qui entraîne une immunodéficience sévère. L'enveloppe du VIH est composée de deux glycoprotéines, la gp120 et la gp41, qui dérivent d'un précurseur, la gp160, par clivage protéolytique. Cinq régions conservées, C1 à C5 et cinq
10 régions variables, V1 à V5, ont été mises en évidence au sein de la glycoprotéine de l'enveloppe. Trois régions fonctionnelles jouent un rôle essentiel dans les premières étapes de l'infection et ont été identifiées : le site de liaison au CD4 (dans la région C4), la région V3, essentielle à l'infectivité et finalement une région très hydrophobe, située à l'extrémité N-terminale de la gp41, qui participe
15 à la fusion entre la membrane de la cellule cible et l'enveloppe virale. La boucle V3 est hypervariable, immunodominante et correspond au déterminant principal inducteur d'anticorps neutralisants (PND).

Il est généralement admis que les anticorps neutralisants jouent un rôle important dans la protection contre l'infection virale (1, 2).

20 Cependant, dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), les anticorps neutralisants qui se développent à un stade précoce de l'infection, n'empêchent pas la progression de la maladie.

En effet, chez les personnes infectées, les anticorps neutralisants, lorsqu'ils existent, présentent un spectre de neutralisation très étroit et souvent
25 ne neutralisent pas la/les souches qui infectent le patient (3, 4). De la même façon, les anticorps neutralisants induits par la vaccination avec la gp160/120 en solution sont généralement spécifiques de la souche utilisée pour la préparation

vaccinale et sont dirigés contre un ou des déterminants dans la boucle V3 de la gp120 (5).

Bien que la boucle V3 soit hypervariable, un tétrapeptide, Gly-Pro-Gly-Arg (GPGR), situé au sommet de la boucle ainsi que deux cystéines à sa base sont présents chez presque la totalité des isolats connus de VIH-1, ce qui indique que cette séquence est essentielle à une étape du cycle vital du virus (6).

Les rôles de la boucle V3 (tropisme cellulaire, infectivité, induction d'anticorps neutralisants de spectre restreint et rôle dans la pathogenèse) ont été mis en évidence (6).

Les Inventeurs ont modifié le gène *env* du VIH-1 en effectuant des délétions éliminant ou réduisant les épitopes hypervariables de la boucle V3. Les résultats, obtenus avec une délétion partielle dans la boucle V3 de la gp160, en respectant la couronne de la boucle V3, c'est-à-dire la séquence GPGRAAF ainsi que les deux cystéines à sa base, montrent que la protéine modifiée $\Delta V3$ -GPGRAAF est exprimée au même titre que la protéine non modifiée et qu'elle réagit avec un sérum de référence humain anti-VIH, à un niveau similaire à la gp160 recombinante non modifiée (7).

Une protéine, dans laquelle la boucle V3 est complètement délé-tée, a également été produite ; il s'agit de la protéine $\Delta V3+$, qui est également exprimée et dont la masse moléculaire est compatible avec la délétion.

L'ensemble de ces éléments a conduit les Inventeurs à formuler l'hypothèse que la boucle V3 représenterait un leurre pour le système immunitaire et que la modification ou l'élimination de cette boucle pourrait induire un changement conformationnel de la molécule, qui se traduirait par l'induction d'une activité neutralisante dirigée contre d'autres épitopes plus conservés, mais qui montrent une faible immunogénicité au cours de l'infection naturelle ou suite à une vaccination avec la protéine native.

Face à l'épidémie de SIDA, la mise au point d'un vaccin anti-SIDA capable d'enrayer la propagation de la maladie est impérative ; en effet, l'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'en 2002, il pourrait y avoir entre 50 et 75 millions de personnes infectées par le VIH, dans le monde.

5 Les Inventeurs se sont, en conséquence, donné pour but de produire une composition vaccinale, qui réponde mieux aux besoins de la pratique en ce qu'elle est apte à induire une réponse immunitaire humorale, cellulaire et mucosale présentant un spectre de neutralisation large, du fait de l'induction d'anticorps aptes à neutraliser différents types de souches de VIH-1 et notam-
10 ment aussi bien des souches de laboratoire que des souches cliniques (isolats primaires).

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une protéine Env recombinante de VIH-1, dans laquelle la boucle V3 est partiellement ou complètement délétée, pour la préparation d'une composition vaccinale, apte à
15 induire une immunité à la fois humorale, cellulaire et mucosale vis-à-vis de souches divergentes du VIH-1.

Les Inventeurs ont maintenant trouvé, de manière surprenante, que les protéines, dans lesquelles la boucle V3 est partiellement ou complètement délétée, sont effectivement aptes à induire une immunité protectrice à large
20 spectre à la fois humorale (anticorps neutralisants), cellulaire (lymphocytes T cytotoxiques) et mucosale (productions d'IgA sécrétoires neutralisantes).

On entend par immunité ou réponse immunitaire à large spectre, l'ensemble des facteurs humoraux et cellulaires qui protègent l'organisme contre une infection à VIH-1, conformément à la définition de J.F. Bach (Traité
25 d'Immunologie, Flammarion, 1993).

Conformément à ladite utilisation, ladite protéine Env recombinante est sélectionnée dans le groupe constitué par les protéines Env dans

lesquelles la boucle V3 est partiellement délétée : protéines gp160 et gp120 recombinantes $\Delta V3$ -GPGRAPH et les protéines Env dans lesquelles la boucle V3 est complètement délétée : protéines Env gp160 et gp120 recombinantes $\Delta V3+$.

La présente invention a également pour objet une composition
5 vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- une protéine Env recombinante, telle que définie ci-dessus,
- éventuellement au moins un composé sélectionné dans le

groupe constitué par :

(1) les adjuvants de vaccination sélectionnés dans le groupe
10 constitué par des dérivés comportant des ions divalents ou trivalents : hydroxyde d'aluminium ou phosphate de calcium et les dérivés du muramylpeptide et

(2) des liposomes et

- éventuellement au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, elle comprend une protéine Env recombinante, telle que définie ci-dessus, ancrée sur des vésicules lipidiques synthétiques unilamellaires ou liposomes (immunosomes) comprenant un rapport molaire phosphatidylcholine:cholestérol de l'ordre de 8:1 et de taille comprise entre 70 et 150 nm, de
20 préférence 90 nm, tels que décrits dans les brevets US 5,766,625, US 5, 753,258, US 5,252,348 et EP 47480.

Une telle composition vaccinale peut avantageusement être administrée soit par voie générale ou systémique : voie orale, voie parentérale, soit par voie locale (rectale, vaginale, par exemple) ; elle est de préférence admi-
25 nistrée par une voie qui implique un contact direct avec une muqueuse, et qui permet ainsi d'obtenir une stimulation de la réponse immunitaire mucoale.

La composition vaccinale selon l'invention peut avantageusement être présentée sous différentes formulations galéniques, particulièrement bien adaptées à la voie d'administration et à l'effet recherché, à savoir l'obtention d'une réponse immunitaire humorale, cellulaire et/ou mucosale.

5 La présente invention a donc également pour objet une formulation galénique destinée à une administration orale, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par :

- un noyau constitué par une composition vaccinale, telle que définie ci-dessus, incluse dans une gélatine et
- 10 - un enrobage sélectionné dans le groupe constitué par un polymère filmogène, soluble ou gonflable dans l'eau et soluble dans les solvants, sélectionné dans le groupe constitué par les dérivés de la cellulose, la polyvinylpyrrolidone, les esters acryliques et méthacryliques, des polyéthylène-glycols, les alcools polyvinyliques, le copolymère vinylpyrrolidone-acétate de vinyle, le
- 15 copolymère vinylpyrrolidone-alcool polyvinylique et des matières protéiques telles que la zéine ou la gliadine.

De préférence, ledit agent filmogène est sélectionné dans le groupe constitué par les esters et les éthers de cellulose, tels que l'acétate de cellulose, l'acétate phtalate de cellulose, le butyrate de cellulose, l'éthylcellulose

20 et la méthylcellulose.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite formulation, ledit polymère filmogène est associé à au moins un agent plastifiant, choisi parmi la glycérine et ses esters, les polyéthylènes glycols de haut poids moléculaire, l'huile de ricin, les esters des acides citrique, phtalique, adipique et sébacique.

25 Une telle formulation, destinée à une administration orale, protège la protéine Env recombinante (antigène) de la dégradation par les protéases gastriques et du pH acide de l'estomac. L'enrobage se solubilise au pH alcalin de

l'intestin ce qui libère l'antigène au voisinage des plaques de Peyer, qui sont les sites majeurs de l'induction d'une immunité mucoale.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite formulation, ladite composition vaccinale est constituée par un mélange lyophilisé d'immunosomes sur lesquels est ancrée une protéine gp120/160 et de tréhalose.

Une formulation préférée destinée à être administrée par voie orale comprend :

- un noyau constitué par un mélange lyophilisé d'immunosomes sur lesquels est ancrée une protéine gp120/160 et de tréhalose, inclus dans de la gélatine et
- un enrobage constitué par un dérivé cellulosique, de préférence, de la cellulose acétate phtalate.

La présente invention a donc également pour objet une formulation galénique destinée à une administration locale au niveau d'une muqueuse (vaginale ou rectale), caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par une composition vaccinale, telle que définie ci-dessus, incluse dans de la glycérine ou un mélange à base de glycérol/glycérine.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite formulation, ladite composition vaccinale est constituée par un mélange lyophilisé d'immunosomes sur lesquels est ancrée une protéine gp120/160 et de tréhalose.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : Préparation de la protéine recombinante env Δ V3-GPGRAPH

Délétion partielle de la boucle V3

Le gène *env* du VIH-1_{LAI} est cloné dans un système baculoviral ; les séquences variables de la boucle V3 ont été éliminées en introduisant une
 5 modification dans le gène *env* de pNL4-3, ne conservant que les nucléotides codant pour l'hexapeptide GPGRAPH et les deux cystéines à la base de la boucle.

Cette modification de la boucle V3 a été réalisée à l'aide de 4 oligonucléotides. Ceux-ci ont été hybridés pour reconstituer la boucle V3 modifiée et clonés directement entre les sites de restriction *Asel* et *NheI* d'un vecteur
 10 intermédiaire, comportant les 1.035 premiers nucléotides du gène *env*, de façon à ne conserver que le motif GPGRAPH et les deux cystéines de la région V3.

La modification introduite dans le gène a été confirmée par séquençage de la région V3 et cloné dans le vecteur de transfert pBacPAK *env*, précédemment construit (7), afin d'obtenir le vecteur de transfert BacPAK
 15 *env* Δ V3-GPGRAPH. Ce dernier a permis de générer le baculovirus recombinant *env* Δ V3-GPGRAPH (7).

Expression du gène *env* recombinant

Des cellules d'insectes Sf21 ont été infectées avec le virus de la polyédrie nucléaire de *Autographa californica* (AcNPV), ainsi qu'avec le baculo-
 20 virus recombinant *env* Δ V3-GPGRAPH. Trois à quatre jours post-infection, les cellules ont été récoltées, lysées en présence de détergent et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % ainsi que par immuno-empreinte (Western blot). Les résultats ont montré que les cellules infectées avec le baculo-
 25 virus recombinant *env* Δ V3-GPGRAPH expriment une protéine dont la masse moléculaire est compatible avec la délétion. Cette protéine est reconnue par un sérum de référence humain positif pour les antigènes de HIV-1 (7).

Purification de la gp160 recombinante $\Delta V3$ -GPGRAPH

La gp160 recombinante Env $\Delta V3$ -GPGRAPH a été purifiée par chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose, suivie d'une purification sur une colonne de lectine *Lens culinaris*, à partir de 2×10^9 cellules Sf21 infectées avec le baculovirus recombinant env $\Delta V3$ -GPGRAPH. L'analyse par électrophorèse a montré que la protéine était pure à plus de 80%.

Exemple 2 : Préparation d'une formulation galénique selon l'invention.

a. Préparation d'Immunosomes avec gp160 recombinante $\Delta V3$ -GPGRAPH

Les Immunosomes ont été préparés par ancrage de la gp160 recombinante $\Delta V3$ -GPGRAPH sur des liposomes préformés, conformément à la méthode décrite dans le brevet EP 47 480. Les Immunosomes- $\Delta V3$ -GPGRAPH se présentent comme des particules d'environ 90 nm, recouvertes de gp160- $\Delta V3$ -GPGRAPH.

b. Formulations de la composition obtenue en a.

Pour les immunisations orales, les immunosomes- $\Delta V3$ -GPGRAPH sont lyophilisés en présence de thréhalose et l'antigène est introduit dans une capsule de gélatine. La capsule est enrobée d'un mélange contenant de la cellulose acétate phtalate, qui protège l'antigène de la dégradation par les protéases gastriques et du pH acide de l'estomac. L'enrobage se solubilise au pH alcalin de l'intestin ce qui libère l'antigène au voisinage des plaques de Peyer, qui sont les sites majeurs de l'induction d'une immunité mucosale.

Pour les immunisations par la voie vaginale ou rectale, l'antigène est formulé dans un mélange à base de glycérol/glycérine, qui est solide à la température ambiante, mais qui fond à la température physiologique du corps, libérant ainsi graduellement l'antigène.

Exemple 3 : Mise en évidence de l'activité immunogène et vaccinale d'une formulation selon l'exemple 2.

Protocole d'immunisation de souris C57/BL

Dans ce protocole d'hyperimmunisation, 12 souris ont reçu
 5 quatre injections d'Immunosomes contenant 25 µg de gp160-ΔV3-GPGRAPH, par la voie intrapéritonéale à trois semaines d'intervalle, suivis d'un rappel par la voie intraveineuse. Aucun adjuvant n'a été utilisé. Six souris témoins ont été soumises au même protocole en utilisant du PBS.

Évaluation de la réponse immunitaire par ELISA contre les
 10 **souches LAI, IIIB, MN, et RF**

Deux semaines après le rappel par la voie intra-veineuse, les souris ont été saignées par une ponction intra-cardiaque et les sérums ont été évalués pour la présence d'anticorps IgM, IgG et IgA, réagissant avec les souches LAI, IIIB, MN, et RF.

15 Toutes les souris ont développé des titres d'anticorps de type IgG très élevés contre chacune des quatre souches testées, se situant entre 1/65.536 à 1/524.288. Les Tableaux I, II, III et IV, montrent que les souris ont également développé des anticorps des trois isotypes contre quatre souches de laboratoire testées.

TABLEAU I

Réponse immune humorale de souris immunisées avec une composition gp160

 Δ V3-GPGRAPH ancrée dans un immunosome

Souris	Immunisations	Antigène	Titre en ELISA des anticorps dirigés contre la souche LAI		
			IgM	IgG	IgA
1	SIX	IMS- Δ GPGRAPH (25 μ g)	1/2 048	1/262 144	1/256
2	idem	idem	1/1 024	1/262 144	1/256
3	idem	idem	1/2 048	1/524 288	1/512
4	idem	idem	1/512	1/131 072	1/256
5	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/128
6	idem	idem	1/2 048	1/262 144	1/256
7	idem	idem	1/1 024	1/262 144	1/256
8	idem	idem	1/1 024	1/65 536	1/128
9	idem	idem	1/4 096	1/524 288	1/1 024
10	idem	idem	1/4 096	1/524 288	1/1 024
11	idem	idem	1/2 048	1/262 144	1/256
12	idem	idem	1/2 048	1/262 144	1/256
13	SIX	PBS	<1/32	<1/32	<1/32
14	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
15	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
16	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
17	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
18	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32

TABLEAU II

Réponse immune humorale de souris immunisées avec une composition gp160
 Δ V3-GPGRAF ancrée dans un immunosome

Souris	Immunisations	Antigène	Titre en ELISA des anticorps dirigés contre la souche IIIB		
			IgM	IgG	IgA
1	SIX	IMS- Δ GPGRAF (25 μ g)	1/2 048	1/262 144	1/256
2	idem	idem	1/1 024	1/262 144	1/256
3	idem	idem	1/2 048	1/262 144	1/512
4	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/256
5	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/128
6	idem	idem	1/2 048	1/131 072	1/256
7	idem	idem	1/1 024	1/262 144	1/256
8	idem	idem	1/1 024	1/65 536	1/128
9	idem	idem	1/4 096	1/131 072	1/1 024
10	idem	idem	1/4 096	1/131 072	1/1 024
11	idem	idem	1/2 048	1/262 144	1/256
12	idem	idem	1/2 048	1/131 072	1/256
13	SIX	PBS	<1/32	<1/32	<1/32
14	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
15	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
16	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
17	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
18	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32

TABLEAU III

Réponse immune humorale de souris immunisées avec une composition gp160
 Δ V3-GPGRAPH ancrée dans un immunosome

Souris	Immunisations	Antigène	Titre en ELISA des anticorps dirigés contre la souche MN		
			IgM	IgG	IgA
1	SIX	IMS- Δ GPGRAPH (25 μ g)	1/2 048	1/131 072	1/256
2	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/256
3	idem	idem	1/2 048	1/131 072	1/512
4	idem	idem	1/1 024	1/65 536	1/256
5	idem	idem	1/1 024	1/65 536	1/128
6	idem	idem	1/2 048	1/65 536	1/256
7	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/256
8	idem	idem	1/1 024	1/65 536	1/128
9	idem	idem	1/4 096	1/131 072	1/1 024
10	idem	idem	1/4 096	1/131 072	1/1 024
11	idem	idem	1/2 048	1/262 144	1/256
12	idem	idem	1/2 048	1/131 072	1/256
13	SIX	PBS	<1/32	<1/32	<1/32
14	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
15	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
16	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
17	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
18	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32

TABLEAU IV

Réponse immune humorale de souris immunisées avec une composition gp160
 Δ V3-GPGRAF ancrée dans un immunosome

Souris	Immunisations	Antigène	Titre en ELISA des anticorps dirigés contre la souche RF		
			IgM	IgG	IgA
1	SIX	IMS- Δ GPGRAF (25 μ g)	1/1 024	1/131 072	1/128
2	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/128
3	idem	idem	1/2 048	1/131 072	1/256
4	idem	idem	1/1 024	1/65 536	1/128
5	idem	idem	1/1 024	1/65 536	1/64
6	idem	idem	1/2 048	1/65 536	1/126
7	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/126
8	idem	idem	1/1 024	1/65 536	1/64
9	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/256
10	idem	idem	1/2 048	1/131 072	1/256
11	idem	idem	1/2 048	1/262 144	1/128
12	idem	idem	1/1 024	1/131 072	1/128
13	SIX	PBS	<1/32	<1/32	<1/32
14	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
15	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
16	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
17	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
18	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32

5

Détermination de la présence d'anticorps capables de neutraliser l'infectivité de souches de laboratoire différentes

Les sérums des souris immunisées avec l'Immunosome gp160- Δ V3-GPGRAF ont ensuite été évalués pour leur potentiel de neutraliser l'infectivité des souches LAI, IIIB, MN, RF LAV 43.01 et BAL. Les essais de neutralisation ont été effectués en utilisant des cellules CEM. Toutes les souris ont développé des anticorps neutralisants allant de 1/1.024 à 1/126, comme illustré aux Tableaux V et VI.

10

TABLEAU V

**Titre en anticorps neutralisants dirigés contre des souches divergentes de
VIH-1 chez des souris immunisées avec la composition vaccinale gp160 ΔV3-
GPGRAPH ancrée dans un immunosome**

5

Souris	Immunisations	Antigène	Titre en anticorps neutrali- sants contre 100 TCID ₅₀ de :		
			LAI	IIIB	RF
1	SIX	IMS-ΔGPGRAPH (25 µg)	1/256	1/256	1/256
2	idem	idem	1/256	1/256	1/256
3	idem	idem	1/512	1/256	1/512
4	idem	idem	1/256	1/128	1/256
5	idem	idem	1/256	1/256	1/128
6	idem	idem	1/256	1/126	1/256
7	idem	idem	1/1 024	1/256	1/256
8	idem	idem	1/64	1/32	1/128
9	idem	idem	1/256	1/256	1/1 024
10	idem	idem	1/256	1/126	1/1 024
11	idem	idem	1/512	1/512	1/256
12	idem	idem	1/256	1/126	1/256
13	SIX	PBS	<1/32	<1/32	<1/32
14	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
15	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
16	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
17	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
18	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32

TABLEAU VI

**Titre en anticorps neutralisants dirigés contre des souches divergentes de
VIH-1 chez des souris immunisées avec la composition vaccinale gp160 Δ V3-
GPGRAF ancrée dans un immunosome**

5

Souris	Immunisations	Antigène	Titre en anticorps neutrali- sants contre 100 TCID ₅₀ de :		
			LAV 4 3.01	MN	BAL
1	SIX	IMS- Δ GPGRAF (25 μ g)	1/256	1/126	1/126
2	idem	idem	1/256	1/126	1/64
3	idem	idem	1/1 024	1/256	1/256
4	idem	idem	1/256	1/128	1/126
5	idem	idem	1/256	1/256	1/128
6	idem	idem	1/256	1/126	1/256
7	idem	idem	1/1 024	1/256	1/256
8	idem	idem	1/32	1/32	1/64
9	idem	idem	1/256	1/256	1/256
10	idem	idem	1/256	1/126	1/126
11	idem	idem	1/1 024	1/512	1/256
12	idem	idem	1/256	1/126	1/126
13	SIX	PBS	<1/32	<1/32	<1/32
14	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
15	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
16	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
17	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
18	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32

**Évaluation du pouvoir neutralisant des sérums contre six
isolats primaires.**

10 Finalement, le pouvoir neutralisant des sérums de souris a été
déterminé contre six isolats primaires : 03908, 65869, 65965, 65870, 65871 et 3929,
générés à partir de co-culture de lymphocytes de patients à différents stades de la
maladie, avec des lymphocytes de donneurs séronégatifs. Les essais de neutrali-
sation ont été effectués en utilisant des PBL non-stimulés. Toutes les souris ont
développé des anticorps capables de neutraliser l'infectivité d'isolats primaires.

A titre d'exemple, voir les tableaux VII et VIII. Les titres étaient généralement très élevés, se situant entre 1/512 et 1/256 contre cinq des six isolats primaires testés. L'isolat 65869 s'est montré plus résistant à la neutralisation. Les titres étaient de 1/64 et de 1/32 et < 1/32 dans quatre des sérums. Cet isolat venait d'un patient en phase terminale de la maladie et le virus a induit de gigantesques syncytia dans les cultures cellulaires.

TABLEAU VII

Titre en anticorps neutralisants dirigés contre des souches divergentes de VIH-1 chez des souris immunisées avec la composition vaccinale gp160 Δ V3-GPGRAF ancrée dans un immunosome

Souris	Immunisations	Antigène	Titre en anticorps neutralisants contre 100 TCID ₅₀ de :		
			# 03908	# 65869	# 65965
1	SIX	IMS- Δ GPGRAF (25 μ g)	1/126	<1/32	1/64
2	idem	idem	1/64	1/32	1/126
3	idem	idem	1/256	1/32	1/126
4	idem	idem	1/126	<1/32	1/256
5	idem	idem	1/256	1/64	1/126
6	idem	idem	1/512	1/32	1/512
7	idem	idem	1/256	1/64	1/256
8	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
9	idem	idem	1/512	<1/32	1/256
10	idem	idem	1/256	1/32	1/126
11	idem	idem	1/512	1/32	1/256
12	idem	idem	1/256	1/32	1/126
13	SIX	PBS	<1/32	<1/32	<1/32
14	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
15	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
16	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
17	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
18	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32

TABLEAU VIII

**Titre en anticorps neutralisants dirigés contre des souches divergentes de
VIH-1 chez des souris immunisées avec la composition vaccinale gp160 Δ V3-
GPGRAPH ancrée dans un immunosome**

5

Souris	Immunisations	Antigène	Titre en anticorps neutrali- sants contre 100 TCID ₅₀ de :		
			# 65870	# 65871	# 3929
1	SIX	IMS- Δ GPGRAPH (25 μ g)	1/64	1/126	1/64
2	idem	idem	1/126	1/126	1/126
3	idem	idem	1/126	1/256	1/256
4	idem	idem	1/256	1/128	1/126
5	idem	idem	1/256	1/126	1/126
6	idem	idem	1/256	1/64	1/256
7	idem	idem	1/126	1/256	1/256
8	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
9	idem	idem	1/256	1/256	1/256
10	idem	idem	1/256	1/126	1/126
11	idem	idem	1/512	1/512	1/256
12	idem	idem	1/256	1/126	1/126
13	SIX	PBS	<1/32	<1/32	<1/32
14	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
15	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
16	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
17	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32
18	idem	idem	<1/32	<1/32	<1/32

Ces résultats montrent que la délétion partielle de la boucle V3, en conservant la séquence conservée, GPGRAPH, favorise l'induction d'anticorps de large spectre, capables de neutraliser différentes souches de laboratoire, mais aussi différents isolats primaires.

10

Des résultats analogues sont obtenus avec la protéine qui contient une délétion totale de la boucle V3.

REFERENCES

- (1) Emini, E/ Schleif W., Numberg, J. *et al.* 1992. Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* 355:728-30.
- 5 (2) Girard, M.P., Kieny, M., Pinter, A., *et al.* 1991. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:542-46.
- (3) Nara P.L. Garrity R.R. Goudsmit J. *et al.* 1991. Neutralization of HIV-1: a paradox of humoral proportion. *FASEB J.* 5:2437-55.
- 10 (4) Palker T.J., Claar, M.E., Langlois A.J. *et al.* 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to *env*-coded peptides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:1932-6.
- (5) Javaherian K., Langlois J., McDonald C., *et al.* 1989. Principal neutralization domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:6768-72.
- 15 (6) Lucinda A., Dubay J.W., Morris J.F. *et al.* 1992. V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. *Virology* 187:423-32.
- (7) Lavallée Claude, and Lise Thibiodeau (1996) Clonage, expression et caractérisation de gp160 du VIH-1, portant des délétions partielles ou
- 20 totales dans la boucle V3. 1996. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 319:983-990.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire

25 toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'une protéine Env recombinante de VIH-1, dans laquelle la boucle V3 est partiellement ou complètement délétée, pour la préparation d'une composition vaccinale, apte à induire une immunité à la fois humo-
5 rale, cellulaire et mucoale vis-à-vis du VIH-1.

2°) Utilisation d'une protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les protéines Env gp160 et gp120 recombinantes dans lesquelles la boucle V3 est partiellement délétée et les protéines Env gp160 et gp120 recombinantes dans lesquelles la
10 boucle V3 est complètement délétée.

3°) Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- une protéine Env recombinante selon la revendication 1 ou la revendication 2,
- éventuellement au moins un composé sélectionné dans le
15 groupe constitué par :

(1) les adjuvants de vaccination sélectionnés dans le groupe constitué par des dérivés comportant des ions divalents ou trivalents : hydroxyde d'aluminium ou phosphate de calcium et les dérivés du muramylpeptide et

(2) des liposomes et
20 - éventuellement au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

4°) Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend une protéine Env recombinante, selon la revendication 1 ou la revendication 2, ancrée sur des vésicules lipidiques synthétiques unilamellaires
25 comprenant un rapport molaire phosphatidylcholine:cholestérol de l'ordre de 8:1 et de taille comprise entre 70 et 150 nm, de préférence 90 nm.

5°) Composition selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle peut avantageusement être administrée par voie générale ou voie locale.

6°) Formulation galénique destinée à une administration orale, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par :

- un noyau constitué par une composition vaccinale, selon la revendication 3 ou la revendication 4, incluse dans une gélatine et
- un enrobage sélectionné dans le groupe constitué par un polymère filmogène, soluble ou gonflable dans l'eau et soluble dans les solvants, sélectionné dans le groupe constitué par les dérivés de la cellulose, la polyvinylpyrrolidone, les esters acryliques et méthacryliques, des polyéthylène-glycols, les alcools polyvinyliques, le copolymère vinylpyrrolidone-acétate de vinyle, le copolymère vinylpyrrolidone-alcool polyvinylique et des matières protéiques telles que la zéine ou la gliadine.

7°) Formulation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit agent filmogène est sélectionné dans le groupe constitué par les esters et les éthers de cellulose, tels que l'acétate de cellulose, l'acétate phtalate de cellulose, le butyrate de cellulose, l'éthylcellulose et la méthylcellulose.

8°) Formulation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit polymère filmogène est associé à au moins un agent plastifiant, choisi parmi la glycérine et ses esters, les polyéthylènes glycols de haut poids moléculaire, l'huile de ricin, les esters des acides citrique, phtalique, adipique et sébacique.

9°) Formulation selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que la composition vaccinale est constituée par un mélange lyophilisé d'immunosomes sur lesquels est ancrée une protéine gp120/160 et de tréhalose.

10°) Formulation selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un noyau constitué par un mélange lyophilisé d'immunosomes sur lesquels est ancrée une protéine gp120/160 et de tréhalose, inclus dans de la
5 gélatine et
- un enrobage constitué par un dérivé cellulosique, de préférence, de la cellulose acétate phtalate.

11°) Formulation galénique destinée à une administration locale au niveau d'une muqueuse, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement consti-
10 tuée par une composition vaccinale, selon la revendication 3 ou la revendication 4, incluse dans de la glycérine ou un mélange à base de glycérol/glycérine.

12°) Formulation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite composition vaccinale est constituée par un mélange lyophilisé d'immunosomes sur lesquels est ancrée une protéine gp120/160 et de tréhalose.

MORGAN, LEWIS & BOCKIUS LLP
1800 M Street, N.W.
Washington, D.C. 20036-5869

In Re Application of Lise Thibodeau *et al.*
Application No. 09/632,806 Group Art Unit: 1645
Filed: October 4, 2000 Examiner: Not Assigned
Title: Use of HIV-1 gp120 and gp160 Proteins Modified in
the V3 Loop for the Preparation of Vaccine Compositions
and Formulations Containing the Same
Attorney Docket No. 045636-5039-US